

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09873

研究課題名(和文) 高分解能質量分析による生体内異所性石灰化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of ectopic calcification by high-resolution mass spectrometry

研究代表者

清水 真人 (Shimizu, Masato)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70380277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：還元糖のカルボニル基はタンパク質のアミノ基と結合し転位反応、酸化反応といった反応を受ける。一連の反応はメイラード反応と呼ばれ生理学的条件下でも起こる。最終的に不可逆的に糖化最終産物(AGEs)が産生され生体内に蓄積する。アラゲブリウムは架橋型AGEsを切断分解することでアテローム性的高血圧症の改善が起こると報告されている。アラゲブリウムの反応はタンパク質を臭化シアンで限定分解することによって間接的に示されたただけだが、本研究でのWestern blot やHPLC2、質量分析を用いた分析化学的手法によって直接分解反応を確認でき生体内でのAGEsの挙動解析にアラゲブリウムが有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内のタンパク質の糖化によって生成した糖化最終産物(AGEs)のうち、特にタンパク質分子間を架橋する架橋型AGEsはタンパク質の代謝を阻害することで蓄積し、動脈硬化や骨粗鬆症など多くの疾病に関わっていると考えられている。歯科においては歯髄内部など異所性の石灰化を引き起こすことが知られていたが、本研究ではAGEs阻害薬やAGEs受容体(RAGE)阻害薬を用い、解析にあたっては免疫染色やHPLC、質量顕微鏡など解析方法を駆使することで異所性石灰化のカスケードの解析を行い、タンパク質の糖化 架橋型AGEs 石灰化流れを明らかにした。糖化が原因と考えられている他の疾病への応用も可能だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The carbonyl group of a reducing sugar binds to an amino group of proteins and is chemically modified by a series of reactions, such as Amadori rearrangement and oxidation. This series of reaction is named Maillard reaction, which occurs under physiological conditions is irreversible. The final products of this reaction are called advanced glycation end products (AGEs). Alagebrium is a chemical compound of potent anti-AGEs. Clinical reports on positive effects of administration of alagebrium for conditions such as hypertension due to arteriosclerosis exist in the literature. In vitro studies have reported that alagebrium digests AGE crosslinkers; this was demonstrated by a difference in the pattern of peptide mapping of collagen molecules with CNBr digestion. However, direct interaction between AGEs and alagebrium has not been reported. Thus, the present study was undertaken to analyze the direct or indirect interaction of AGEs with alagebrium, using western blot and HPLC analyses.

研究分野：歯科保存分野

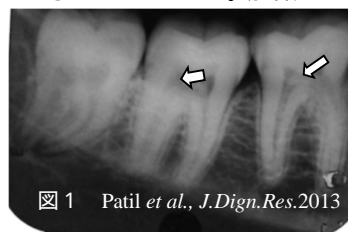
キーワード：糖化最終産物(AGEs) 歯髄内結石 架橋型AGEsペントシジン AGEs阻害薬アラゲブリウム RAGE阻害薬FPS-ZM1 蛍光分析 質量顕微鏡 免疫染色

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

還元糖は生理条件下でタンパク質のアミノ基と結合し、転位反応や酸化反応を経て不可逆的に糖化最終産物 (Advanced Glycation End products: AGEs) を生成する。血中の糖は身体各所のタンパク質と結合し AGEs として蓄積し、動脈硬化症、骨粗鬆症、後縦靭帯骨化症、白内障など、神経系においては糖尿病性神経症や認知症などに関与していると考えられている。加齢によって経年的に蓄積する糖尿病においては前記の疾病の罹患、進行を早めることが知られている。

歯科臨床領域においては歯周病が糖尿病の進行と関連があるとされる報告や糖尿病患者にしばしば歯髄内結石が比較的高頻度で観察されると報告されている (Patil *et al.*, Journal of Diagnostic Research. 2013, 7(6): 1228-1231、図 1)



このような本来石灰化の生じない場所での異所性石灰化のメカニズムとして AGE/AGEs 受容体 (RAGE) のシグナル伝達系の関与が示唆されてはいるが、*in situ* での形態学的なアプローチからの解析はなされておらず詳細なメカニズム解明には至っていない。

2. 研究の目的

AGEs が引き金となる歯や生体各所における炎症反応や異所性石灰化メカニズムを解明し、関連する炎症反応の抑制や、異所性石灰化反応をコントロールすることで新たな覆髄剤の開発の基板となるデータを採取し、将来的な異所性石灰化によって生じる後縦靭帯骨化症をはじめとした難病の疾病メカニズムを解明の足掛かりとなる解析方法や現象データ蓄積を目指す。

3. 研究の方法

ヒトの抜去歯を用いた研究では抜歯が行われた時点での AGEs の蓄積状態や分布状態といった静的な情報しか得られなく、さらに近年では歯の保存治療が主流となっており外部環境のコントロールが難しく、意図的に血糖値を上昇させるといった介入研究が不可能である。そこで本研究では 2 型糖尿病モデルラット (図 2:SDT-Fatty rat) を用いて血糖値の上昇にともなう AGEs 増加の過程など動的な解析を進めることにした。これまでに血糖値の上昇にともなう糖尿病モデルラットの臼歯歯髄内も顕著な歯髄内結石を認め、免疫 d v 染色や高速液体クロマトグラフィーを用いてラットの血中、血管、尾腱などに架橋型 AGEs ペントシジンや付加型 AGEs カルボキシメチルリジン (CML) の分布状態を確認している。MALDI 型質量顕微鏡においても特異的なシグナルを認めている (図 3)。

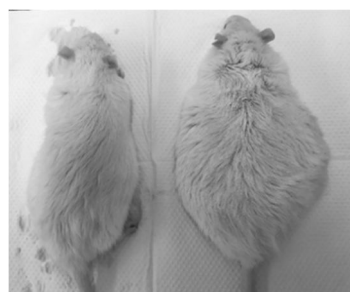


図 2

SDT-Fatty

SDT-fatty

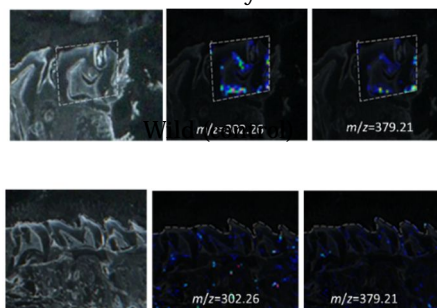


図 3 MALDI ISD による質量イメージング

AGEs が異所性石灰化反応の起点になるのか、また反応経路にどのような影響を与えているかを調べるため、架橋型 AGEs を分解す

る効果があるとされるアラゲプリウム (Vasan *et al.*, Nature vol.382.July 1996) や RAGE の

細胞内シグナルの伝達を阻害する FPS-ZM1 (Shen *et al.*, *Neurochem. Res.* **2017**, *42*, 2902–2911) を SDT-Fatty に投与し解析を行った。

- (1) アラゲブリウムと架橋型 AGEs の直接の相互作用に関する研究は少ない。アラゲブリウムの架橋型 AGEs 分解に関しては直接、架橋型 AGEs を分解している *in vitro* での研究結果はなく、臨床的には投与によるアテローム性動脈硬化症の改善や、*in vitro* では糖化タンパク質を臭化シアン分解したペプチドマッピングによって間接的に示されていた。本研究ではまず、糖化コラーゲンを用いて架橋型コラーゲンの分解反応を架橋型 AGEs であるペントシジンの抗体を用いた Western Blott を用いて確認を行った。
- (2) アラゲブリウム、FPS-ZM1 の SDT-Fatty への投与前後の歯髄内石灰化の状態の変化をマイクロ CT を用いた解析、尾腱コラーゲン、血管内への AGEs の沈着の状態を免疫化学的手法や HPLC を用いた分析を行った。

4 . 研究成果

我々は架橋型 AGEs の一種であるペントシジンとアラゲブリウムの相互作用を Western blot, 蛍光検出 HPLC で解析し、アラゲブリウムは架橋型 AGEs ペントシジンは分解するが、付加型 AGEs である CML は分解しないという AGEs への作用の特異性を示した (図 4、図 5)。

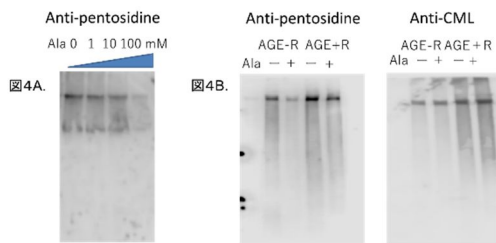


図 4. Western blot analyses with anti-pentosidine and anti-CML. A) Calf skin collagen solutions were glycated using 250mM ribose with several concentrations of alagebrum chloride (0, 1, 10, and 100mM) for 40 days at 37°C. B) Addition of 100mM alagebrum chloride bovine Achilles tendon collagen followed by glycation; 250mM ribose solution was eliminated by dialysis (AGE-R) or using co-existing ribose solution (AGE+R) for 9 days at 37°C.

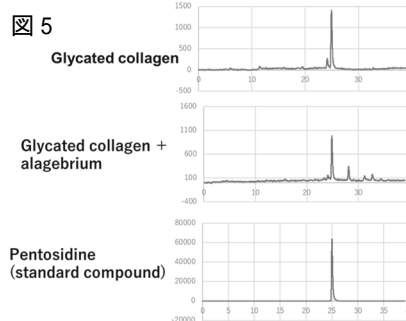


図 5

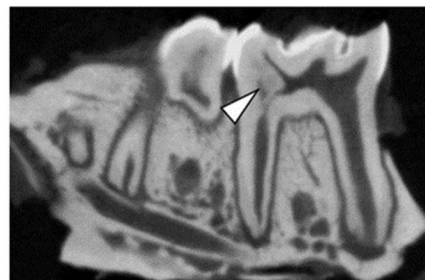


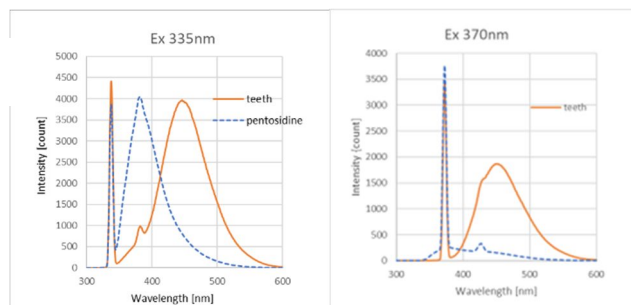
図 6 . コントロールラットの臼歯

2 型糖尿病ラット SDT-Fatty 臼歯

2 型糖尿病モデルラット SDT-Fatty を用いた歯髄内石灰化はアラゲブリウム投与ラットにおいては石灰化物の減少がみられ、FPS-ZM1 では減少した

ものの有意差は認められなかった。典型的な歯髄内結石を図 6 に示す。架橋型 AGEs の一つであるペントシジンをターゲットに質量分析や蛍光分光分析、液体クロマトグラフィーを使用し生体内でのペントシジン生成と架橋型 AGEs 分解アラゲブリウムや RAGE の阻害剤 FPS-ZM1 を用いることで AGEs が歯髄内石灰化に影響を与えていることが確認できた。また架橋型 AGEs が象牙質のような生物試料ではペントシジン以外の架橋型 AGEs が多種類あることが蛍光分光

図 7



法によって示唆されており(図 7)、現在ペントシジン以外の架橋型 AGEs についてアラゲブリウムとの相互作用の解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashima Aoi, Miura Jiro, Sugiyama Keita, Shimizu Masato, Okada Misa, Otani Tomohiro, Nagashima Tadashi, Tsuda Tetsuya, Araki Tsutomu	4. 巻 0
2. 論文標題 Glycation promotes pulp calcification in Type 2 diabetes rat model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.14529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水真人、杉山敬多、高島葵、岡田美佐、三浦治郎
2. 発表標題 架橋型糖化最終産物（AGEs）とAGEs阻害薬アラゲプリウムの相互作用の解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会（徳島）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田美佐、清水真人、杉山敬多、高島葵、三浦治郎
2. 発表標題 糖尿病ラットにおける歯髄内血管糖化と阻害法の検討
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会（徳島）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山敬多、清水真人、高島葵、岡田美佐、三浦治郎
2. 発表標題 糖化ゼラチンスポンジによるラット臼歯部への直接覆髄法の評価
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会（徳島）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上垣 浩一 (Uegaki Kouichi) (00356544)	近畿大学・農学部・教授 (34419)	
研究分担者	野崎 剛徳 (Nozaki Takenori) (30263304)	大阪大学・歯学部附属病院・准教授 (14401)	
研究分担者	三浦 治郎 (Miura Jiro) (70437383)	大阪大学・歯学部附属病院・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------